

IFW

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventors: K. Kondo et al.

Attorney Docket No. SUSU122563

Application No.: 10/798,750

Group Art Unit: 1639

Filed: March 10, 2004

Title: PARTIAL HOMOLOGOUS RECOMBINATION OF DNA CHAIN

LETTER TRANSMITTING PRIORITY DOCUMENTS

Seattle, Washington 98101

TO THE COMMISSIONER FOR PATENTS:

Enclosed is a certified copy of the following application for which a claim of priority under 35 U.S.C. § 119 has been made:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>	<u>Title</u>
Japan	2003-068176	March 13, 2003	PARTIAL HOMOLOGOUS RECOMBINATION OF DNA CHAIN

Respectfully submitted,

CHRISTENSEN O'CONNOR  
JOHNSON KINDNESS<sup>PLLC</sup>Jeffrey M. Sakoi  
Registration No. 32,059  
Direct Dial No. 206.695.1713

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service in a sealed envelope as first class mail with postage thereon fully prepaid and addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the below date.

Date:

AUGUST 16, 2004

JMS:snh

LAW OFFICES OF

CHRISTENSEN O'CONNOR JOHNSON KINDNESS<sup>PLLC</sup>  
1420 Fifth Avenue  
Suite 2800  
Seattle, Washington 98101  
206.682.8100

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 3月13日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-068176  
[ST. 10/C]: [JP2003-068176]

願 人  
Applicant(s):

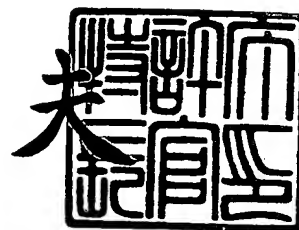
株式会社アイシン・コスモス研究所  
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2004年 3月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A000300635

【提出日】 平成15年 3月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09  
C12N 15/10

【発明の名称】 部分的なDNA鎖の相同的組換えによる遺伝子除去方法  
および遺伝子取得方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市かずさ鎌足2-3-9 かずさパーク内  
株式会社アイシン・コスモス研究所内

【氏名】 近藤 和博

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 財団法人かずさ  
ディー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 大石 道夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 財団法人かずさ  
ディー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 小原 収

【特許出願人】

【識別番号】 593043200

【氏名又は名称】 株式会社 アイシン・コスモス研究所

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

## 【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108855

【弁理士】

【氏名又は名称】 蔵田 昌俊

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100075672

【弁理士】

【氏名又は名称】 峰 隆司

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100109830

【弁理士】

【氏名又は名称】 福原 淑弘

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 0 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「ゲノムインフォマティクス技術」委託研究、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの）

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9702061

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 部分的なDNA鎖の相同的組換えによる遺伝子除去方法および遺伝子取得方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法であって、

(1) 前記第二のdsDNAの第一の鎖の3'末端部分に相同な配列を含み、且つその3'末端の塩基配列が前記第二のdsDNAの3'末端の塩基配列とは異なった第三のss核酸と、RecAタンパク質とを前記DNAライブラリーに添加し、前記第二のdsDNAの3'末端部分と前記第三のss核酸の相同的組換えを行わせることにより、前記第二のdsDNAの3'末端部分に、前記第二のdsDNAの第一の鎖、前記第三のss核酸および前記第二のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分を形成する工程と；

(2) 工程(1)で得られた相同的組換え体を含むDNAライブラリーにエキソヌクレアーゼIを添加して、前記三本鎖部分における第二のDNAの第一の鎖部分を消化する工程と；

(3) ライゲーション処理を施し、前記第一のdsDNAを環状化する工程と；

(4) 工程(3)の処理を施したDNAから線状DNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する工程と；  
を備えた方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記DNAライブラリーは、環状DNAライブラリーであり、前記工程(1)の前に、環状dsDNAを切断する工程を、さらに備えた方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の方法であって、前記ライゲーション処理が自己ライゲーションである方法。

【請求項4】 含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAを濃縮することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法であって、

(1) 前記第一のdsDNAの第一の鎖の3'末端部分に相同な配列を含み、且つ制

制限酵素切断部位を形成し得る配列をその3'末端部分に含む第三のss核酸と、前記第三のss核酸の3'末端部分とハイブリダイズ可能で且つそのハイブリダイズ部分に制限酵素切断部位を形成できる配列を含み、且つ標識を含む第四のss核酸とを混合し、前記第三のss核酸の3'末端部分と前記第四のss核酸をハイブリダイズさせることにより第五の核酸を形成すると共に、該第五の核酸の二本鎖部分に制限酵素切断部位を形成する工程と；

(2) 前記DNAライブラリーに、RecAタンパク質と工程(1)で得られた第五の核酸を添加し、前記第一のdsDNAの一部と前記第五の核酸中の前記第三のss核酸部分との間で相同的組換えを行わせることにより、前記第一のdsDNAの第一の鎖、前記第三の核酸部分、前記第一のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分を形成し、その場合に前記第五の核酸中の前記第四の核酸部分の3'末端が前記第一のdsDNAの第二の鎖の5'末端に隣接する工程と；

(3) 前記工程(2)で得られたDNAライブラリーにエキソヌクレアーゼIを添加して、前記三本鎖部分における前記第一のDNAの第一の鎖部分を消化する工程と；

(4) 前記DNAライブラリーから、前記第四のss核酸を含む複合体を、標識を媒介して回収する工程と；

(5) 前記工程(4)で回収した前記複合体に適切な制限酵素を作用させることにより、前記制限酵素部位で切断する工程と；

(6) 前記工程(5)で切断したDNAにライゲーション処理を施し、前記第一のdsDNAを環状化する工程と；

(7) 工程(6)の処理を施したDNAから線状DNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する工程と；  
を備えた方法。

【請求項5】 請求項4に記載の方法であって、前記DNAライブラリーは、環状DNAライブラリーであり、前記工程(1)の前に、環状dsDNAを切断する工程を、さらに備えた方法。

【請求項6】 請求項4または5に記載の方法であって、前記ライゲーション処理が自己ライゲーションである方法。

【請求項7】 含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することにより、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットであって、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとを含むことを特徴とするキット。

【請求項8】 含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAを濃縮することにより、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットであって、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとを含むことを特徴とするキット。

【請求項9】 請求項9に記載のキットであって、さらにビオチン標識オリゴヌクレオチドと、ストレプトアビジンビーズとを含むことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、部分的なDNA鎖の相同的組換えによる遺伝子除去方法および遺伝子取得方法に関する。詳細には、RecAタンパク質を使用して、DNAライブラリーから所望の核酸以外の核酸を除去することにより、所望の核酸の含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

DNAライブラリー、とりわけ c DNAライブラリーは、遺伝子をクローニングするための極めて有用なツールである。これまでに、c DNAライブラリーから多くの遺伝子がクローニングされている。クローニングされた遺伝子は、遺伝子自身の塩基配列を決定するのに用いられるのみならず、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を決定したり、該タンパク質を細菌や酵母細胞内で大量に作らせるために用いられている。

【0 0 0 3】

しかしながら、c DNAライブラリーから容易にクローニングし得る c DNAは、その鋳型となった m R N A が細胞中に大量に発現している c DNAに限られるため、



多くの遺伝子がクローニングされた現在では、クローニングし易い c DNA の多くは殆どクローニングされてしまい、新規な c DNA を効率よくクローニングすることが困難になりつつある。

#### 【 0 0 0 4 】

c DNA ライブラリーから新規な c DNA を効率よくクローニングするためには、既にクローニングされた c DNA をライブラリーから除去することが必要であり、この目的のために以下のような技術が考案されている。

#### 【 0 0 0 5 】

この目的を達成するために使用されている最も基本的な方法としては、差引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)がある。

#### 【 0 0 0 6 】

該方法では、目的の遺伝子を発現している細胞（又は組織）と目的の遺伝子を発現していない細胞から m R N A を調製し、一方から c DNA を合成した後、両者をハイブリダイゼーションさせるので、両細胞に共通する c DNA のみが除去され、ある組織や細胞に特異的に発現している遺伝子を濃縮、単離することが可能となる。

#### 【 0 0 0 7 】

上記差引きハイブリダイゼーションの例としては、メンブレン上における差引きハイブリダイゼーション法およびヒドロキシアパタイトカラムを用いた差引きハイブリダイゼーション法が知られている(非特許文献1、非特許文献2)。

#### 【 0 0 0 8 】

しかし、メンブレン上における差引きハイブリダイゼーションでは、一度に多くのコロニーを処理することが難しいため、ライブラリー全体の再構築には向いていない。また、偽陽性または偽陰性のシグナルも多いため、検討に時間がかかるという問題を有している。

#### 【 0 0 0 9 】

また、ヒドロキシアパタイトカラムを用いた差引きハイブリダイゼーション方法では、サイズが 3 k b を超えるような比較的長い配列を含む c DNA ライブラリーの場合、非特異的ハイブリダイゼーションが起こる可能性が高くなるため、0

． 4～2. 5 k b 程度の比較的短い DNA からなる c DNA にしか適用できなかった。長い配列は、多機能タンパクや複雑な構造のタンパク質をコードする機能的に重要な遺伝子を含む可能性が高いので、長い配列を含むライブラリーに適用し得ないことは、本方法の大きな欠点である。また、同一の遺伝子に由来し、3' 末端と 5' 末端が共通であるが、中央が異なる配列は、短い c DNA であっても該方法では区別することができない。

#### 【 0 0 1 0 】

同様の目的を達成するために多用される他の方法として、ディファレンシャルディスプレイ法が知られている (非特許文献 3)。また、この方法を改良した、PCR を用いた差引ハイブリダイゼーションが知られている (非特許文献 4)。

#### 【 0 0 1 1 】

しかし、これらの方法では、発現レベルの差が著しい場合でないと泳動パターンに差が見いだせず、偽陽性もしくは偽陰性のシグナルが多という欠点も存する。また、クローンを直接得ることができないので、PCR 産物を基に何らかの方法によりクローンを選択する必要がある。

#### 【 0 0 1 2 】

一方、遺伝子ライブラリーから所望の遺伝子を取得するための従来技術として、上記メンブレン上におけるハイブリダイゼーションが知られている (非特許文献 1)。

#### 【 0 0 1 3 】

該方法では、上述した通り、大腸菌等の宿主が生息するプレートから、メンブレンフィルター上にコロニーまたはプラークを写し取る。このようにして作製されたフィルターに対して、検出プローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。シグナルを与えるコロニーまたはプラークは、目的とする遺伝子断片を含むと予想される。従って、そのコロニーまたはプラークを単離培養することにより、目的とする遺伝子断片を取得することができる。

#### 【 0 0 1 4 】

しかし、この技術では、一度に多くのコロニーを処理することが難しいため、まれにしか存在しない遺伝子の取得には向いていない。また、偽陽性または偽陰

性のシグナルが多く存在するために検討に時間を要する。

【0 0 1 5】

また、液相におけるハイブリダイゼーションを利用する方法も知られている（非特許文献5）。

【0 0 1 6】

該方法では、M13複製改正点を有するベクターを使用してライブラリーを構築する。これを大腸菌内または試験管内で環状一本鎖ライブラリーに変換する。標識されたプローブと液相中でハイブリダイゼーションを行い、次いで標識を特異的に認識する物質で固相に吸着させることによって単離する。固相からDNAを回収した後、二本鎖DNAに変換する。これを使用して大腸菌を形質転換させることにより、目的とする遺伝子を取得することができる。

【0 0 1 7】

しかし、この方法では、70%以上の配列が相同である場合、同様に反応してしまうため、任意の場所にプローブを設計することができない。

【0 0 1 8】

その他、ライブラリーから所望の遺伝子を取得するために、RecAを用いたクローニングも開示されている（特許文献1）。

【0 0 1 9】

該方法は、標識されたプローブと液相中で三本鎖を形成させる。次いで、標識を特異的に認識する物質で固相に該三本鎖を吸着させることによって単離する。固相からDNAを回収した後、このDNAで大腸菌を形質転換することにより、目的とする遺伝子を得ることができる。

【0 0 2 0】

しかし、この方法では、開環状二本鎖DNAしか反応に使用することができないため、特異性および効率が必ずしも高くないという問題がある。

【0 0 2 1】

さらに、三本鎖構造によるDNA伸長反応阻害を用いたクローニングも開示されている（特許文献2）。

【0 0 2 2】

該方法は、ライブラリー遺伝子を制限酵素で切断したのち、その末端で三本鎖を形成させる。目的とする遺伝子断片を含むクローンでは三本鎖が形成されることとなる。その結果、三本鎖が形成されたクローンではDNAポリメラーゼにより伸長反応の基質とならないので、その他のクローンのみが伸長されることとなる。反応後、三本鎖を解消させて、DNAを再連結させることにより、目的のクローンを得ることができる。

**【 0 0 2 3 】**

しかし、この方法は、特異性を高めると効率が高くなり、効率を高めると特異性が低くなるという問題を有している。

**【 0 0 2 4 】**

さらに、本発明者は、これまでに、RecAタンパク質を用いて所望の遺伝子の含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法を開示しているが、線状DNAライブラリーを加工することはできず、さらなる改良が望まれていた（特許文献4）。

**【 0 0 2 5 】****【特許文献1】**

特表平6-500926号公報

**【 0 0 2 6 】****【特許文献2】**

特表平11-206381号公報

**【 0 0 2 7 】****【特許文献3】**

特表平11-509423号公報

**【 0 0 2 8 】****【特許文献4】**

特開2001-346576号公報

**【 0 0 2 9 】****【非特許文献1】**

Hedrick SM et al., Isolation of cDNA clones encoding T cell-sp

specific membrane-associated proteins.、 “Nature”、 (UK)、 1984年、 5955巻、 p.149-53

【 0 0 3 0 】

【非特許文献2】

Bonaldo MF et al.、 Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery.、 “Genome Res”、 (USA)、 1996年、 9巻、 p.791-806

【 0 0 3 1 】

【非特許文献3】

Liang P et al.、 Analysis of altered gene expression by differential display.、 “Methods Enzymol”、 (USA)、 1995年、 254巻、 p.304-21

【 0 0 3 2 】

【非特許文献4】

Diatchenko L et al.、 Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes.、 “Methods Enzymol”、 (USA)、 1999年、 303巻、 p.349-80

【 0 0 3 3 】

【非特許文献5】

Invitrogen Instruction Manual、 Gene Trapper cDNA Positive Selection System、 Cat. No.10356-020

【 0 0 3 4 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来技術に存する上記課題を解決するためになされたものであり、DNAライブラリーから、所望のDNAを特異的に濃縮または除去されたDNAライブラリーを作製することが可能であり、且つ該DNAのクローンを直接取得することができる方法を提供することを目的とする。

【 0 0 3 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明の第一の態様において、RecAタンパク質を用いて環状DNAライブラリー

から特定のDNAを除去することにより、所望の核酸の含有率が増加した環状DNAライブラリーを構築する方法を提供する。

#### 【 0 0 3 6 】

すなわち、本発明は、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法であって、

(1) 前記第二のdsDNAの第一の鎖の3'末端部分に相同な配列を含み、且つその3'末端の塩基配列が前記第二のdsDNAの3'末端の塩基配列とは異なった第三のss核酸と、RecAタンパク質とを前記DNAライブラリーに添加し、前記第二のdsDNAの3'末端部分と前記第三のss核酸の相同的組換えを行わせることにより、前記第二のdsDNAの3'末端部分に、前記第二のdsDNAの第一の鎖、前記第三のss核酸および前記第二のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分を形成する工程と；

(2) 工程(1)で得られた相同的組換え体を含むDNAライブラリーにエキソヌクレアーゼIを添加して、前記三本鎖部分における第二のDNAの第一の鎖部分を消化する工程と；

(3) ライゲーション処理を施し、前記第一のdsDNAを環状化する工程と；

(4) 工程(3)の処理を施したDNAから線状DNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する工程と；  
を備えた方法を提供する。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明の第二の態様において、RecAタンパク質を用いてDNAライブラリーから特定のDNAを除去することにより、所望の核酸の含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法を提供する。

#### 【 0 0 3 8 】

すなわち、本発明は、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAを濃縮することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法であって、

(1) 前記第一のdsDNAの第一の鎖の3'末端部分に相同な配列を含み、且つ制限酵素切断部位を形成し得る配列をその3'末端部分に含む第三のss核酸と、前記

第三のss核酸の3'末端部分とハイブリダイズ可能で且つそのハイブリダイズ部分に制限酵素切断部位を形成できる配列を含み、且つ標識を含む第四のss核酸とを混合し、前記第三のss核酸の3'末端部分と前記第四のss核酸をハイブリダイズさせることにより第五の核酸を形成すると共に、該第五の核酸の二本鎖部分に制限酵素切断部位を形成する工程と；

(2) 前記DNAライブラリーに、RecAタンパク質と工程(1)で得られた第五の核酸を添加し、前記第一のdsDNAの一部と前記第五の核酸中の前記第三のss核酸部分との間で相長的組換えを行わせることにより、前記第一のdsDNAの第一の鎖、前記第三の核酸部分、前記第一のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分を形成し、その場合に前記第五の核酸中の前記第四の核酸部分の3'末端が前記第一のdsDNAの第二の鎖の5'末端に隣接する工程と；

(3) 前記工程(2)で得られたDNAライブラリーにエキソヌクレアーゼIを添加して、前記三本鎖部分における前記第一のDNAの第一の鎖部分を消化する工程と；

(4) 前記DNAライブラリーから、前記第四のss核酸を含む複合体を、標識を媒介して回収する工程と；

(5) 前記工程(4)で回収した前記複合体に適切な制限酵素を作用させることにより、前記制限酵素部位で切断する工程と；

(6) 前記工程(5)で切断したDNAにライゲーション処理を施し、前記第一のdsDNAを環状化する工程と；

(7) 工程(6)の処理を施したDNAから線状DNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する工程と；  
を備えた方法を提供する。

#### 【0039】

さらに、本発明は、上記第一の態様および第二の態様のDNAライブラリーを構築する方法であって、前記DNAライブラリーは、環状DNAライブラリーであり、前記工程(1)の前に、環状dsDNAを切断する工程さらに備え、および前記ライゲーション処理が自己ライゲーションである方法を提供する。

#### 【0040】

さらに、本発明は、上記方法を利用して、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットであって、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとを含むことを特徴とするキットを提供する。

#### 【0041】

また、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、前記第一のdsDNAを取得することによって、前記第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットであって、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとを含むことを特徴とするキットを提供する。

#### 【0042】

特に、上記キットであって、さらにビオチン標識オリゴヌクレオチドと、ストレプトアビジンビーズとを含むことを特徴とするキットを提供する。

#### 【0043】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、RecAタンパク質を介して形成される三本鎖構造が標的核酸の末端領域に形成される場合には、三本鎖構造からRecAタンパク質を解離させた後にも三本鎖構造が維持されるという本発明者らの発見に基づいてなされたものである。このように、RecAタンパク質を介して三本鎖構造が形成されること、およびRecAタンパク質自体は公知である。

#### 【0044】

ここで、本発明の方法に応用したRecAタンパク質およびRecAタンパク質の作用機構について説明する（図1）。

#### 【0045】

RecAタンパク質は、相同的組換え、DNAの修復、又は大腸菌のSOS遺伝子の発現などに関与することが知られている。RecAタンパク質の中では、大腸菌やλファージのRecAタンパク質が最も有名である。しかしながら、大腸菌のRecAタンパク質に類似した構造及び機能を有するタンパク質は、大腸菌以外の生物にも広



く分布していることが知られており、これらのタンパク質は、一般に、RecA類似タンパク質と呼称されている。

#### 【0046】

図1のようにRecAタンパク質は、一本鎖DNAに結合した後（RecA—一本鎖DNA繊維）、該一本鎖DNAを二本鎖DNAに対合させて三元複合体（トリプレックス）を形成し、相同DNAの検索を行った後、ATP存在下でDNA鎖交換反応を触媒する。DNA鎖交換反応後には、一本鎖DNAが二本鎖DNAに取り込まれた雑種二本鎖DNAと元の二本鎖DNAから分離された一本鎖DNAが形成される。このとき、元の二本鎖DNAよりも一本鎖DNAが短い場合は、元の二本鎖DNAの一部のみで交換反応が起こることになる。また、交換される一本鎖DNAの末端が、元の二本鎖DNAと異なっている場合には、末端配列の異なる雑種二本鎖DNAが生じることになる。

#### 【0047】

前述のように、RecAタンパク質は、一本鎖核酸を二本鎖核酸にランダムに結合させるのではなく、二本鎖核酸の一方のストランド中に存在する相同な領域に結合させる。二つの核酸が「相同」であるということは、RecAタンパク質を介して特異的な三本鎖構造を形成し得る程度に、両核酸が同一であること、又は類似していることを意味する。すなわち、両核酸が同一の配列に対してハイブリダイズ可能であることを意味する。「類似」とは、例えば、二つの塩基配列が少なくとも50%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の同一性であり得る。

#### 【0048】

本発明の方法は、RecAタンパク質を介して一本鎖DNAと該一本鎖DNAに相同な二本鎖DNAを結合させて、三本鎖構造DNAが形成されることを利用して、DNAライブラリーから所定のDNAを除去する方法である。

#### 【0049】

本明細書において、「RecAタンパク質」とは、二本鎖核酸の一方のストランド中の任意の領域に、該領域と相同な一本鎖核酸を結合させることにより、前記領域に三本鎖構造を形成させ得るタンパク質を意味する。

#### 【0050】

また、RecAタンパク質には、大腸菌や $\lambda$ ファージのRecAタンパク質のみならず、RecA類似タンパク質も含まれる。上述のように、本発明の方法では、RecAタンパク質が相同なDNAの対合を促進し、三本鎖構造DNAの形成を触媒する機能を有する限り、本発明の方法において、前記RecA類似タンパク質も使用することができる。

#### 【0051】

本発明で使用するのに好ましいRecAタンパク質は、大腸菌のRecAタンパク質である。

#### 【0052】

本明細書において、「DNAライブラリー」なる語は、多種類のDNA断片の集合体を意味し、主に遺伝子ライブラリーとcDNAライブラリーを総称する用語として使用する。「遺伝子ライブラリー」とは、ファージ又はコスミドに含まれる単一の生物種の全ゲノムDNA断片の集合体であり、「ゲノムDNAライブラリー」と同義である。「cDNAライブラリー」とは、ベクターに挿入された、特定の組織や細胞由来のmRNAから作成される相補的DNA（以下cDNAと称する）から作成される多種類のcDNA分子種の集合体をいう。前記DNA断片は必ずしもファージ、コスミド、またはプラスミド中に含まれて環状化されている必要はなく、たとえばインサート部分のDNA断片のみからなっているもよい。DNAライブラリーに含まれるDNA断片の種類は何種類でもよく、2種類であってもよい。

#### 【0053】

また、本明細書において、二本鎖DNAまたは二本鎖RNAおよび一本鎖DNAまたは一本鎖RNAは、それぞれdsDNAまたはdsRNAおよびssDNAまたはssRNAと略記し、一本鎖核酸は、一本鎖DNAまたは一本鎖RNAを表し、ss核酸と略記する。

#### 【0054】

以下、本発明の方法の詳細について述べる。

#### 【0055】

本発明の第一の態様において、RecAタンパク質を使用して、DNAライブラリーから特定のDNAを除去することにより、所望の核酸の含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法を提供する。

## 【 0 0 5 6 】

まず、本発明の方法の工程 (1) では、DNAライブラリーから除去すべき第二の dsDNA のいずれか一方の鎖 (これを第一の鎖とする) の 3' 末端部分と相同な配列を含み、且つその 3' 末端の塩基配列が第二の dsDNA の 3' 末端の塩基配列とは異なった第三の ss 核酸を作製する。

## 【 0 0 5 7 】

3' 末端部分とは、核酸配列の 3' 末端近くの領域を含む部分であり、具体的には、3' 末端または 3' 末端の数塩基前から少なくとも 10~40 番目の塩基まで、より好ましくは 60 番目の塩基まで、さらに好ましくは 80 番目の塩基まで、さらに好ましくは 100 番目の塩基まで、またはそれ以上の塩基までを含む領域を意味する。

## 【 0 0 5 8 】

ここで、上記第三の ss 核酸は、除去すべき第二の dsDNA のいずれか一方の鎖 (第一の鎖) の 3' 末端部分と相同な配列を含んでいればよく、したがって第二の dsDNA の 3' 末端部分と相同な配列以外の配列を含んでいてもよい。好ましくは、相同ではない配列は、第三の ss 核酸の 3' 末端部分に含まれる。また、上記第二の dsDNA のいずれか一方を第一の鎖とすると、他方の鎖が第二の鎖となる。

## 【 0 0 5 9 】

一方、上記第三の ss 核酸は、第二の dsDNA の 3' 末端と同一の 3' 末端を有してはならない。すなわち、第二の dsDNA の 3' 末端に一以上の塩基が欠失または付加された末端配列を有する必要がある。これにより、以下のライゲーション工程で環状化されることがなくなる。

## 【 0 0 6 0 】

第二の dsDNA の第一の鎖に相同な配列を含む第三の ss 核酸の作製は、いずれの方法によって行ってもよいが、たとえばインビトロ転写系を使用することができる。たとえば、ssDNA を調製する場合、DNA ライブラリー (所望のインサート) をインビトロ転写可能なベクター (たとえば p S P O R T 1、pBlueScriptSKII など) に載せ換えて、S P 6 転写システム (A m b i o n 社) を使用して RNA 合成を行う。次に、適切なプライマー (R o n d o m p r i m e r N6 (宝社) など)、および逆転写酵素 (S u p e r S c r i p t I I R T (i n v i

t r o g e n 社) など) を使用して c DNA を合成する。

#### 【 0 0 6 1 】

最後にフェノール・クロロホルムによってタンパク質を除去して、c DNA を精製することにより、ssDNA を得ることができる。また、ssRNA を作製するのであれば、上記 RNA 合成工程までを行えばよい。上記のような c DNA および RNA の調製方法は、当業者に周知であろう。

#### 【 0 0 6 2 】

その他、dsDNA を ssDNA にする操作としては、p B l u e s c r i p t、p G E M、p u c 199 等のファージミドベクターをファージ粒子として使用し、ssDNA を回収する操作もあるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 6 3 】

また、以下の実施例に示したように、化学合成により DNA および RNA を作製する方法も当業者に周知であり、これらを利用することもできる。

#### 【 0 0 6 4 】

なお、上記第一および第二の dsDNA は、プラスミドやウイルスベクターに担持されており、環状 DNA ライブラリーであることが通常であろう。このように DNA ライブラリーが環状である場合、以下の工程では dsDNA は線状化されていることが必要なため、環状 DNA を線状 DNA にする操作を施す必要がある。環状 DNA を線状 DNA にする方法としては、たとえば、適切な制限酵素で環状 DNA を切断すればよい。たとえば、インサート DNA がマルチクローニングサイト等に挿入されているのであれば、該インサートの挿入に使用した部位を制限酵素で切断すればよい。また、インサート部分を切り出して第一または第二の dsDNA として使用してもよい。制限酵素により、環状 DNA ライブラリーの一以上の箇所を切断してもよいが、環状 DNA の一カ所のみを切断するものを選択することが好ましい。前記制限酵素による切断は、当業者であれば容易に適切な部位で切断することができるであろう。

#### 【 0 0 6 5 】

次に、RecA タンパク質と第二の ssDNA を、線状 DNA ライブラリーを含む溶液に添加する。

## 【 0 0 6 6 】

上記のようにして得られた第二のdsDNAに対応する第三ssDNAは、その5'末端部分に第二のdsDNAの3'末端と相同な塩基配列を含んでいる。したがって、第二のssDNAとRecAタンパク質を加えると、三本鎖構造DNAの形成反応が進行される（図1を参照）。

## 【 0 0 6 7 】

RecAタンパク質は、ATPの存在下において、相同的な組換えを触媒するタンパク質なので、試料中にATPが存在すると相同的組換えが進行する。したがって、第二のdsDNAの第一の鎖の3'末端部分と第三のss核酸が相同組換えされて、第二のdsDNAの3'末端部分に、第二のdsDNAの第一の鎖、第三のss核酸および第二のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分が形成される（図1を参照）。

## 【 0 0 6 8 】

上記相同的組換え反応は、適切な反応条件、バッファーにおいて行なわれる。たとえば30mMトリス酢酸（pH6.9）、1mM酢酸マグネシウム、1mMジチオスレイトール、100ng程度の第三のss核酸および1 $\mu$ gのRecAタンパク質（EPICENTRE）を含む20 $\mu$ lの溶液を、10mMトリス酢酸（pH6.9）、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、第一および第二のdsDNAを含むDNAライブラリーの10 $\mu$ lの溶液を混合し、37℃において15分間保温すればよい。

## 【 0 0 6 9 】

次に、工程（2）では、工程（1）で得られた相同的組換え体を含むDNAライブラリー溶液にエキソヌクレアーゼIを添加して、上記三本鎖部分における第二のDNAの第一の鎖部分（第三のssDNAと交換された部分）を消化させる。エキソヌクレアーゼIは、一本鎖DNAを3'→5'方向に分解する酵素であり、適切な条件下で該酵素を添加することにより消化させることが可能である。また、同様の活性を有するその他の酵素を使用して、消化することもできる。

## 【 0 0 7 0 】

上記エキソヌクレアーゼIによる消化反応は、たとえば、上記混合液に20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼI（EPICENTRE）を含む30mMトリス酢酸（pH6.9）、9mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトールを10 $\mu$ lの反応開始液として添加し

、37℃において1時間反応させることによって行うことができる。

#### 【0071】

生じた反応混合液は、以下の工程を行う前にタンパク質を除去しておくことが好ましい。タンパク質の除去は、通常の方法を使用して行えばよく、たとえばフェノール/クロロホルム処理することによって行うことができる。

#### 【0072】

次に、工程（3）では、工程（2）で得られたdsDNAを含むDNAライブラリーをライゲーションして環状化させる。

#### 【0073】

工程（1）において、環状DNAライブラリーを切断してDNAライブラリーとして使用した場合は、自己ライゲーション反応が生じさせる。このとき、工程（2）で相同的組換えが生じたDNAは、3'末端の塩基配列が異なっているため、ライゲーション反応が阻害される。一方、相同組換えされていないdsDNA（第一のdsDNA）は、ライゲーションされて環状DNAが形成される（図2）。

#### 【0074】

本明細書において、「自己ライゲーション」とは、一本の線状DNAの5'末端と3'末端がライゲーションされて、環状DNAとなることを意味する。

#### 【0075】

また、インサートDNAなどの線状DNAライブラリーを使用した場合は、適切な制限酵素で消化したベクターを添加してインサートをベクター内に挿入し、環状化させる。この場合も、相同的組換えが生じたDNAでは、3'末端の塩基配列が異なっているため、ライゲーション反応が阻害される。一方、相同組換えされていないdsDNA（第一のdsDNA）は、ライゲーションされて環状DNAが形成される。

#### 【0076】

上記のようなライゲーション反応は、通常の方法を使用して行えばよい。たとえば、T4 DNA Ligase（Invitrogen社）によってライゲーション反応（37℃において30分間）を行って環状DNAを構築することができる。また、その他の商業的に入手可能なライゲーションキット等を使用してもよい。

#### 【0077】

本発明において、上記工程（1）から工程（4）からなるサイクルを、さらに2回以上繰り返してもよい。

#### 【0078】

工程（4）では、上記工程で得られたDNAから線状DNAを除去することによって、第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する。

#### 【0079】

除去すべき線状DNAと含有率を増加させるべき環状DNAとを分離するには、たとえば、アガロース電気泳動で分離する方法、臭化エチジウム存在下で遠心する方法、などを使用することができる。その他、使用したDNAライブラリー内に薬剤耐性遺伝子が含まれている場合は、前記DNAを宿主に形質転換して、環状DNAが形質転換された宿主のみを薬剤で選択する方法を使用してもよいが、これらに限定されない。

#### 【0080】

また、本発明の方法において、上記RecAタンパク質を介して三本鎖構造を形成させる工程に続いて、上記三本鎖核酸に結合したRecAタンパク質を解離させる工程を実施してもよい。

#### 【0081】

本発明の方法の説明において、図2および上記の説明では、便宜上、2種類のdsDNAの中から1種類のdsDNAを除去する操作を記載したが、実際の操作では、数千～数万種類のdsDNAの中から数十～数万種類のdsDNAを同時に、または順次に除去することもできる。

#### 【0082】

本発明の第二の態様において、RecAタンパク質を使用して、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、第一のdsDNAを濃縮することによって、第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法を提供する。

#### 【0083】

本方法の工程（1）では、第三のss核酸と第四のss核酸とを作製する。第三のss核酸は、DNAライブラリーにおいて濃縮すべき第一のdsDNAの第一の鎖の3'末端

部分に相同な配列を含み、且つ該ss核酸の3'末端部分に制限酵素切断部位を形成し得る配列を含むように作製する。

#### 【0084】

ここで、上記第三のss核酸は、濃縮すべき第一のdsDNAのいずれか一方の鎖（第一の鎖）の3'末端部分と相同な配列を含んでいればよく、したがって第一のdsDNAの3'末端部分と相同な配列、または制限酵素切断部位を形成しうる配列以外の配列を含んでいてもよい。また、上記第一のdsDNAのいずれか一方の鎖を第一の鎖とすると、他方の鎖が第二の鎖となる。

#### 【0085】

第四のss核酸は、第三のss核酸の3'末端部分（すなわち制限酵素切断部位を形成し得る配列を含む）とハイブリダイズ可能で且つそのハイブリダイズ部分に制限酵素切断部位を形成できる配列を含むように作製する。また、該第四のss核酸の3'末端は、第二のdsDNAの5'末端に隣接する配列を有し、且つ第四のss核酸には標識をしておく。

#### 【0086】

第三のss核酸は、具体的には、以下のように設計すればよい。まず、第三のss核酸の3'末端部分は、第四のss核酸とハイブリッドを形成したときに制限酵素切断部位を形成するように、適切な制限酵素切断部位を形成し得る配列が含まれるように設計する。これにより、以下の工程でライブラリーから回収した後に切断し、容易に標識を除去することが可能となる。

#### 【0087】

制限酵素切断部位を形成し得る配列は、いずれの酵素によって切断される配列であってもよいが、以下の工程においてライゲーション可能な末端配列であることが好ましい。制限酵素切断配列としては、たとえばDNAライブラリーに含まれるマルチクローニングサイトの配列であることが好ましい。具体的には、以下の実施例5に示したように、5'-第二のdsDNAに相同な配列-制限酵素切断配列-3'を含むように設計することができる。

#### 【0088】

このような第三のssDNAの作製は、本発明の第一の態様に記載したように、い



ずれの方法によって行ってもよいが、たとえばインビトロ転写系を使用することができる。逆転写を行う際のプライマーとして、所望の制限酵素配列が含まれるように設計したプライマーを使用することにより、第三のss核酸を容易に作成することもできるであろう。たとえば、環状DNAライブラリーのマルチクローニングサイトを切断して一本鎖としたDNAを第一のdsDNAとする場合、該マルチクローニングサイトに相補的な配列を制限酵素切断配列としてプライマーを作製し、逆転写反応を行えばよい。また、化学合成によりDNAおよびRNAを作製する方法も当業者に周知であり、これらを利用することもできる。

#### 【0089】

第四のss核酸は、上記第三の核酸の3'末端部分とハイブリダイズ可能で且つそのハイブリダイズ部分に制限酵素切断部位を形成できる配列を含むように設計する。第三の3'末端部分とハイブリダイズ可能な配列は、第三のss核酸の3'末端部分に相補的な配列であることが好ましい。また、第四のss核酸の3'末端は、以下の工程で相同的組換えを行ったときに、第一のdsDNAの第二の鎖の5'末端に隣接するように設計される。

#### 【0090】

さらに、第四のss核酸には、以下の工程で回収することが可能な標識をしておく。標識は、以下の工程で回収可能な標識であればいずれの標識であってもよいが、たとえばビオチン標識である。また、標識は、第五の核酸の形成が可能な部位であればいずれの部位になされてもよいが、好ましくは、5'末端に標識されていることが好ましい。

#### 【0091】

具体的には、以下の実施例5に示したように、5'-(標識)-第三のdsDNAに3'末端部分とハイブリダイズ可能な配列(すなわち、制限酵素切断配列を含む)-3' (この3'末端は、第二のdsDNAの5'末端に隣接する)を有するように設計することができる。

#### 【0092】

上記のような標識核酸は、化学合成によって作製することができる。たとえばビオチン標識オリゴヌクレオチドであれば、ビオチン標識ヌクレオチドを使用し

て化学合成することによって作製する方法が当業者に周知である。このような標識オリゴヌクレオチドは商業的に入手可能であり、これらを利用することもできる。

#### 【0093】

次に、第三のss核酸と第四のss核酸を、あらかじめ溶液中で混合し、熱変性して冷却しておく。これにより、それぞれ第三のss核酸の制限酵素切断部位を形成し得る配列部分および第四のss核酸の制限酵素切断部位を形成し得る配列部分を介してハイブリッドが形成され、第五の核酸を形成するとともに、該第五の核酸の二本鎖部分に制限酵素切断部位を形成する。詳細には、該ハイブリッド形成は、第三のss核酸と第四のss核酸の混合液を94℃に加熱し、その後冷却することによって行うことができる。

#### 【0094】

次に、工程(2)では、DNAライブラリーを含む溶液に、RecAタンパク質と、工程(1)で得られた第五の核酸(第三のss核酸と第四のss核酸のハイブリッド)を添加する(図3)。その結果、第一のdsDNAの一部と、第五の核酸中の第三のss核酸との間に相同的組換えが生じる。相同的組換えは、上記第一の態様の方法と同様に、適切な反応条件、バッファーにおいて行なわれる。たとえば、30mMトリス酢酸(pH6.9)、1mM酢酸マグネシウム、1mMジチオスレイトール、第五の核酸(第三のss核酸と第四のss核酸のハイブリッド) 100ngと1 $\mu$ gのRecAタンパク質(EPICENTRE)を含む20 $\mu$ lの溶液を、30mMトリス酢酸(pH6.9)、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、第一のdsDNAを含むDNAライブラリー50ngを含む10 $\mu$ lの溶液を混合し、37℃において15分間保温すればよい。

#### 【0095】

上記相同組換えが生じた結果、第一のDNAの第一の鎖、第三の核酸部分、第一のdsDNAの第二の鎖からなる三本鎖部分が形成される。このとき、第五の核酸中の第四の核酸部分の3'末端は、第一のdsDNAの第二の鎖の5'末端に隣接することとなる。

#### 【0096】

次に、工程(3)では、工程(2)で得られたDNAライブラリーにエキソヌクレ

アーゼIを添加する。その結果、形成された三本鎖部分における第一のDNAの第一の鎖部分が消化される（図3）。このエキソヌクレアーゼIによる消化も、上記第一の態様の方法と同様に行えばよい（第一の態様の方法の工程（2）を参照）。

#### 【0 0 9 7】

エキソヌクレアーゼIによる消化した後、上記したようにタンパク質を除去しておくことが好ましい。

#### 【0 0 9 8】

次に、工程（4）では、DNAライブラリーから、標識を媒介して第四のss核酸をDNA含む複合体を回収する（図3）。この複合体には、第一の核酸の第一の鎖（一部が消化されている）と、第一の核酸の第二の鎖と、第三の核酸および第四の核酸（第五の核酸）とが含まれている。

#### 【0 0 9 9】

該複合体の回収は、第四のss核酸の標識を介して行われる。たとえば、第四のss核酸の標識がビオチン標識の場合、ストレプトアビジンビーズを使用してDNA複合体を結合させて、回収することができる。具体的には、複合体を含む溶液にストレプトアビジンビーズを添加して結合させればよい。また、複合体の回収は、標識に応じて、種々の方法で回収することができる。たとえば、標識に対する抗体が固定化されたビーズなどを使用してもよい。

#### 【0 1 0 0】

また、上記回収の後、複合体を結合した担体等を洗浄して、固定化されていない核酸（DNAライブラリーのうち、第一の核酸以外の核酸）を除去しておくことが好ましい。

#### 【0 1 0 1】

次に、工程（5）では、工程（4）で回収した複合体に適切な制限酵素を作用させて、第五の核酸の制限酵素切断部位で切断を行う。制限酵素は、第五の核酸（第三のss核酸/第四のss核酸のハイブリッド）の制限酵素切断部位を切断可能な酵素が使用される。すなわち、第三のss核酸の設計において組み込んだ制限酵素切断部位を形成し得る配列を切断する酵素を使用すればよい。

#### 【0 1 0 2】

本工程によれば、上記工程で回収した標識は、ストレプトアビジンビーズ等の複合体回収用の担体に結合されたままである。一方、所望の制限酵素配列で切断されたDNA複合体だけが回収用の担体から切断される。したがって、所望の核酸部分のみを容易に回収することができ、標識部分の分離/精製を必要としない。

#### 【0 1 0 3】

また、制限酵素で切断後、上記したようにタンパク質を除去しておくことが好ましい。

#### 【0 1 0 4】

次に、工程（6）では、工程（5）で切断したDNAにライゲーション処理を施し、前記第一のdsDNAを環状化する。

#### 【0 1 0 5】

さらに、次の工程では、線状DNAを除去することにより、第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する。

#### 【0 1 0 6】

DNAの環状化および線状DNAの除去は、上記本発明の第一の態様において記載したように行えばよい。たとえば、インサートDNAなどの線状DNAライブラリーを使用した場合は、通常のクローニングと同様に所望のベクター内に挿入すればよい。具体的には、上記工程（5）で使用した制限酵素と同じ配列で切断したベクター内に、得られたインサートDNAを挿入して環状化させればよい。

#### 【0 1 0 7】

また、本発明の第三の態様において、上記方法を使用して、所望のDNA含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットが提供される。

#### 【0 1 0 8】

上記第一の態様の方法により、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、該第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することにより、該第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットには、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとが含まれる。

#### 【0 1 0 9】

また、上記第二の態様の方法により、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、該第一のdsDNAを濃縮することにより、該第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築するためのキットとには、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとが含まれる。

#### 【0110】

具体的には、上記本発明の方法によるDNAライブラリーの構築を行うためのキットには、RecAタンパク質と、適切なバッファーと、エキソヌクレアーゼIとが別々に含まれるキットであってもよい。たとえば、たとえば上記方法によるDNAライブラリーの構築を行うための一回の量として、1 $\mu$ g RecAタンパク質、20unit エキソヌクレアーゼIが該キットに含まれ、適切なバッファーとして、RecAタンパク質が作用可能なバッファー、およびエキソヌクレアーゼIが作用可能なバッファーを含むことができる。適切なバッファーは、たとえば、30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、1mM 酢酸マグネシウム、1mM ジチオスレイトールの溶液と、30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、9mM 酢酸マグネシウム、2mM ジチオスレイトールの溶液であってもよく、上記方法を行う際に、両溶液にRecAタンパク質、エキソヌクレアーゼIをそれぞれ溶解、混合して使用されてもよい。好ましくは、RecAタンパク質およびエキソヌクレアーゼIは、適切なバッファーに溶解された状態で提供される。たとえば、RecAタンパク質は、30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、1mM 酢酸マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、RecAタンパク質1 $\mu$ gを含む分部交換反应用液Iとして、エキソヌクレアーゼIは、20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼIを含む30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、9mM 酢酸マグネシウム、2mM ジチオスレイトールを10 $\mu$ l 反応開始液として、適切なバッファーに混合された状態で提供されることが好ましい。さらに、該キットは、上記内容物以外のものを含んでいてもよく、たとえばDNAライブラリーの構築に必要なDNA(たとえばプラスミドDNA)、適切な制限酵素などを含んでいてもよい。

#### 【0111】

さらに、上記第二の態様の方法により、DNAライブラリーを構築するためのキットには、上記内容物の他に、(上記第二の態様の方法における第四のssDNAとして) 標識ヌクレオチドと、該標識を回収可能な担体とを含むことが好ましい。

特に、標識ヌクレオチドは、ビオチン標識されたヌクレオチドであり、該ビオチン標識を介して標識ヌクレオチドを回収可能な担体は、ストレプトアビジンビーズであることが好ましい。

#### 【0112】

以下、実施例によって、本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【0113】

なお、図に示されている具体的な反応や構造などは、あくまでも理解を容易にする目的で記載されているにすぎないので、実際には、それらの細部が図面と一致しない場合があり得る。

#### 【0114】

##### 【実施例】

##### (実施例1)

インサートなしプラスミドの除去

分部交換反应用液Iは、30mMトリス-酢酸 (pH6.9)、1mM酢酸マグネシウム、1mMジチオスレイトール、ベクターpBlueScriptSKII(+)配列特異的オリゴDNA(5'-ATCCGATAAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC-3')100ngと1 $\mu$ gRecAタンパク質(EPICENTRE)を含む20 $\mu$ lの溶液である。分部交換反应用液IIは、30mMトリス-酢酸(pH6.9)、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、インサートの有無があるプラスミドDNA混合物を一箇所のみ切断する制限酵素NotIにより消化した線状二本鎖DNA50ngを含む10 $\mu$ lの溶液である。IおよびIIを混合した後、37℃において15分間保温してから、20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼ I(EPICENTRE)を含む30mMトリス-酢酸(pH6.9)、9mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトールを10 $\mu$ l反応開始液として添加した。37℃において1時間反応させた。除タンパク質操作後、ライゲーション反応を行い、これを大腸菌に導入してプラスミドを回収した。ベクターは、99%以上除去されていることがわかる(図4)。

#### 【0115】

##### (実施例2)

プラスミド除去とオリゴヌクレオチドの長さ。

## 【0 1 1 6】

分部交換反応用液Iは、30mMトリス-酢酸 (pH6.9)、1mM酢酸マグネシウム、1 mMジチオスレイトール、ベクターpBlueScriptSKII(+)配列特異的オリゴDNAである、pBSSN25:5'-GGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC-3'、pBSSN30:5'-CCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC-3'、pBSSN40:5'-ATTCCTGCAGCCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC-3'、pBSSN60:5'-ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC-3'を各100ngと1  $\mu$  g RecAタンパク質 (EPICENTRE) を含む20  $\mu$  lの溶液である。分部交換反応用液IIは、10mMトリス-酢酸 (pH6.9)、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、インサートの有無があるプラスミドDNA混合物を一箇所のみ切断する制限酵素NotIにより消化した線状二本鎖DNA50ngを含む10  $\mu$  lの溶液である。IおよびIIを混合した後、37℃において15分間保温してから、20mM ATP、20 unit エキソヌクレアーゼ I (EPICENTRE) を含む30mMトリス-酢酸 (pH6.9)、9mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトールを10  $\mu$  l反応開始液として添加した。37℃において1時間反応させた。除タンパク質操作後、ライゲーション反応を行い、これを大腸菌に導入してプラスミドを回収した。

## 【0 1 1 7】

40塩基以上でベクター除去効率が顕著によいことが判明した (図5)。

## 【0 1 1 8】

## (実施例3)

RNAを用いたベクター除去

pBlueScriptSKII(+)をNotIで消化後、T7プロモーターを用いて試験管内でRNA合成を行い、常法に従ってRNAを精製した。

## 【0 1 1 9】

分部交換反応用液Iは、30mMトリス-酢酸 (pH6.9)、1mM酢酸マグネシウム、1 mMジチオスレイトール、試験管内で合成されたRNA100ngと1  $\mu$  g RecAタンパク質 (EPICENTRE) を含む20  $\mu$  lの溶液である。分部交換反応用液IIは、10mMトリス-酢酸 (pH6.9)、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、インサートの有無があるプラスミドDNA混合物を一箇所のみ切断する制限酵素NotIにより消化した線状二本鎖DNA50ngを含む10  $\mu$  lの溶液である。IおよびIIを混合した後、37℃に

において15分間保温してから、20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼ I (EPICENTRE) を含む30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、9mM 酢酸マグネシウム、2mM ジチオスレイトールを10  $\mu$  l 反応開始液として添加した。37℃において1時間反応させた。除タンパク質操作後、ライゲーション反応を行い、これを大腸菌に導入してプラスミドを回収した。

#### 【0 1 2 0】

RNAを用いても除去反応が可能であることが判明した (図6)。

#### 【0 1 2 1】

(実施例4)

cDNAライブラリーから存在量の多いクローンの除去

ヒト脳由来プラスミドcDNAライブラリーの挿入遺伝子を片方の末端で切断する制限酵素MulIで消化した。このプラスミドを鋳型としてT3転写システム (Ambion) でRNA合成を行った。それぞれ得られたRNA 5  $\mu$  g に Random primer 6 (宝) 6.25  $\mu$  g を添加して熱変性した後、氷水で急冷する。RNase inhibitor (東洋紡) 40unit、5×First strand buffer (Invitrogen) 1  $\mu$  l を添加した。次いで、Superscript II RT (Invitrogen) 5  $\mu$  l を添加して20  $\mu$  l にした。これを37℃で60分間反応させてcDNAを合成する。次いで、フェノール・クロロホルムにより除タンパク質をした後、cDNAを精製する。

#### 【0 1 2 2】

分節交換反应用液Iは、30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、1mM 酢酸マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、100ngの逆転写されたcDNAと1  $\mu$  g RecAタンパク質 (EPICENTRE) を含む20  $\mu$  l の溶液である。分節交換反应用液IIは、10mM トリス-酢酸 (pH6.9)、25mM 酢酸マグネシウム、2mM ジチオスレイトール、インサートの有無があるプラスミドDNA混合物を一箇所のみ切断する制限酵素NotIにより消化した線状二本鎖DNA 50ngを含む10  $\mu$  l の溶液である。IおよびIIを混合した後、37℃において15分間保温してから、20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼ I (EPICENTRE) を含む30mM トリス-酢酸 (pH6.9)、9mM 酢酸マグネシウム、2mM ジチオスレイトールを10  $\mu$  l 反応開始液として添加した。37℃において1時間反応させた。タンパク質分解操作をした後DNAを精製する。T4DNA Ligase (Invitrogen) により、37℃で30



分間ライゲーション反応を行い、DNAを精製した。次いで、大腸菌を形質転換することによって存在量の多いクローンの除去を行った。

### 【0 1 2 3】

除去前後のライブラリー0.1ng、1ng、10ng、100ng、を鋳型として用いて、存在量の多い遺伝子3種類および少ない遺伝子3種類の変化をPCRによって検討した。存在量の多い遺伝子は除去され、存在量の少ない遺伝子が相対的に濃縮されていることが明らかである（図7）。

### 【0 1 2 4】

（実施例5）

希少遺伝子の濃縮

希少遺伝子を単離するモデル実験として、ヒト・アルファ2マクログロブリン遺伝子断片を含むプラスミドの濃縮実験を行った。

### 【0 1 2 5】

目的とするクローンを用いて試験管内でT3プロモーターによりRNA合成を行った。そのRNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドC23R600:5'-GAACCCAAAGCCCACACCAG-3'をプライマーとして逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成した。T3プロモーター近傍からマルチクローニングサイトを含むビオチン化標識オリゴヌクレオチドbio-T3BstX:5'-GGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGAG-3'と逆転写されたcDNAを混合して熱変性後、会合させる。

### 【0 1 2 6】

分部分交換反应用液Iは、30mMトリス-酢酸（pH6.9）、1mM酢酸マグネシウム、1mMジチオスレイトール、ビオチン化標識オリゴヌクレオチドを会合させたcDNA100ngと1μgRecAタンパク質（EPICENTRE）を含む20μlの溶液である。分部分交換反应用液IIは、10mMトリス-酢酸（pH6.9）、25mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール、目的とする遺伝子を様々な割合で含むプラスミドDNAを一箇所のみ切断する制限酵素NotIにより消化した線状二本鎖DNA50ngを含む10μlの溶液である。IおよびIIを混合した後、37℃において15分間保温してから、20mM ATP、20unit エキソヌクレアーゼ I（EPICENTRE）を含む30mMトリス-酢酸（pH6.9）、9mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトールを10μl反応開始液として添加した。37℃に

において1時間反応させた。除タンパク質操作後、ストレプトアビジンビーズ (Dynal) によってプラスミドを分離した。制限酵素NotI消化を行い、ストレプトアビジンビーズからプラスミドを回収し、上記同様にライゲーションを行った。次いで、これを大腸菌に導入した。

#### 【0 1 2 7】

上記処理を行わないで直接ライゲーションした後、これを大腸菌に導入した場合と比較して、1000倍以上の濃縮があることがPCR (C23F198:5'-CAGGACTCCAGCAAAGCACT-3'、M13F:5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') により判明した (図8)。

#### 【0 1 2 8】

##### 【発明の効果】

本発明の第一の態様の方法により、所望のDNAライブラリーから所望の核酸以外の核酸を除去することが可能となり、所望の核酸の含有率が増加したDNAライブラリーを構築することができる。

#### 【0 1 2 9】

また、本発明の第二の態様の方法により、所望のDNAライブラリーから所望の核酸を取得することが可能となり、所望の核酸の含有率が増加したDNAライブラリーを構築することができる。

#### 【0 1 3 0】

さらに、本発明のキットを使用することにより、上記DNAライブラリーの構築および上記所望の核酸の取得が容易となる。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

本発明の部分的DNA鎖交換の作用機構の概略図。

#### 【図 2】

本発明の遺伝子除去方法の基本原理を示した図。

#### 【図 3】

本発明の遺伝子濃縮方法の基本原理を示した図。

#### 【図 4】

インサートなしプラスミドを除去した結果を示す電気泳動写真。

**【図 5】**

プラスミド除去とオリゴヌクレオチドの長さの関係を示す電気泳動写真。

**【図 6】**

RNAを使用してベクターを除去した結果を示す電気泳動写真。

**【図 7】**

cDNAライブラリーから存在量の多いクローンを除去した結果を示す電気泳動写真。

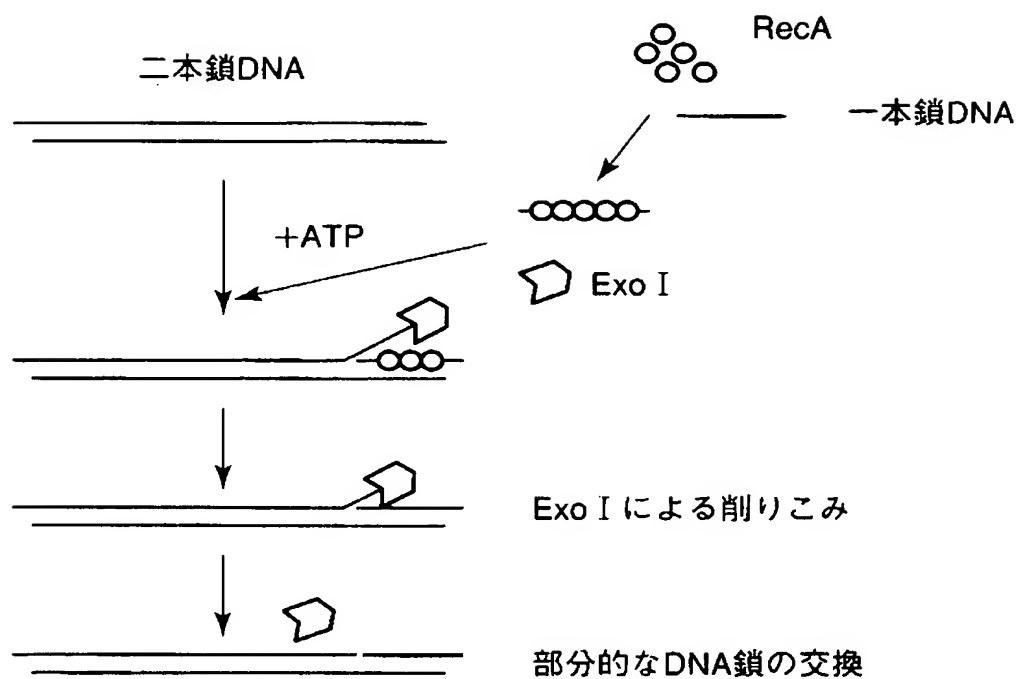
**【図 8】**

希少遺伝子を濃縮した結果を示す電気泳動写真。

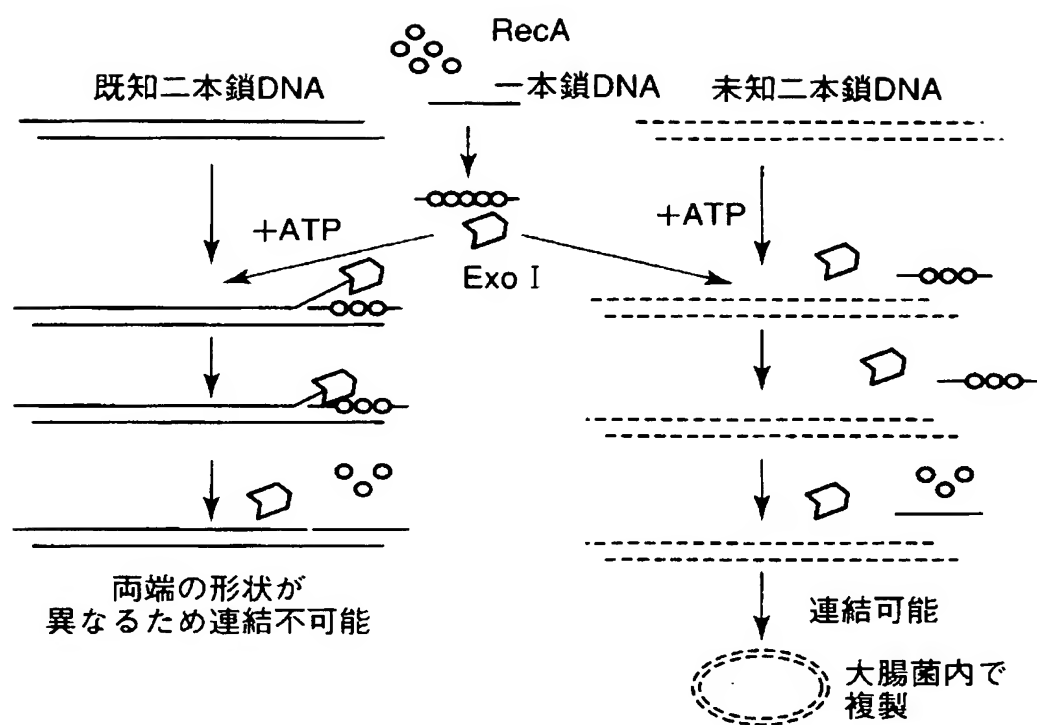
【書類名】

図面

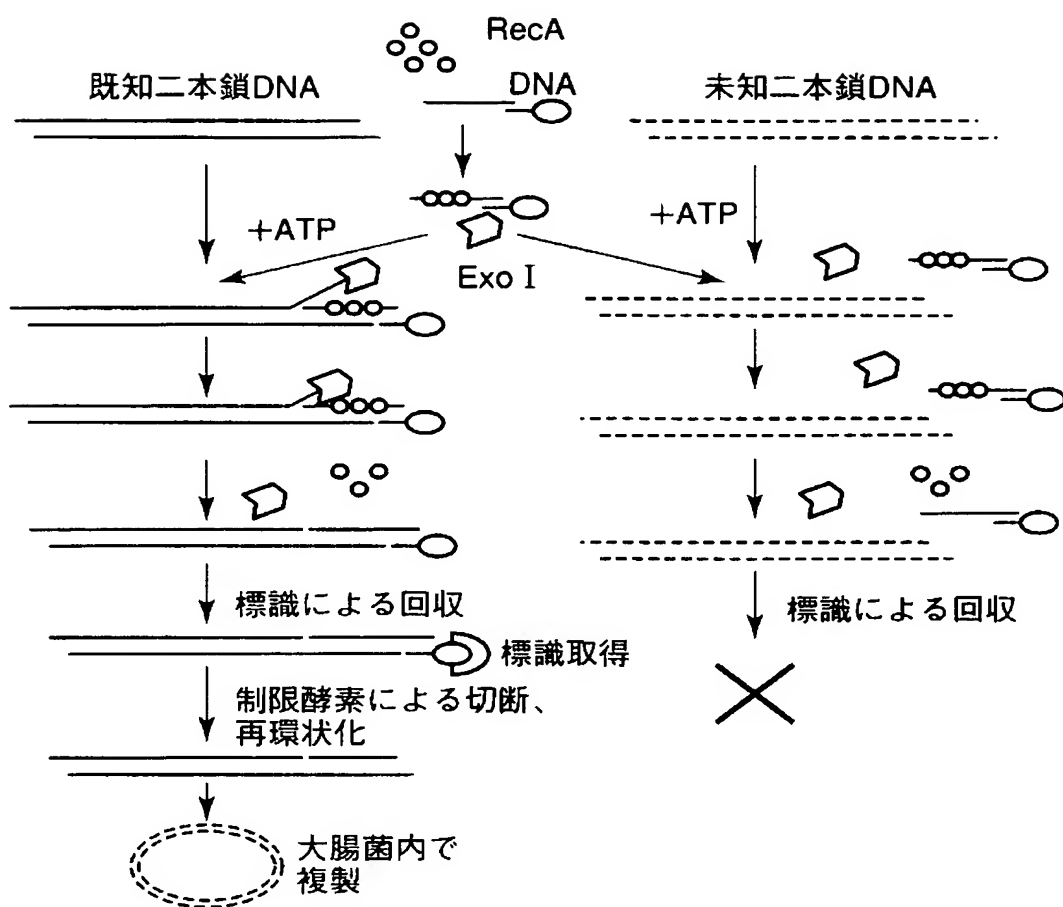
【図 1】



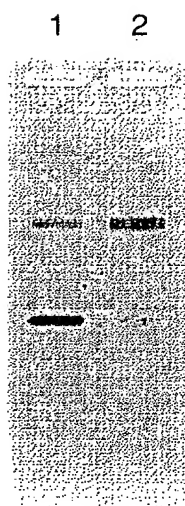
【図 2】



【図3】



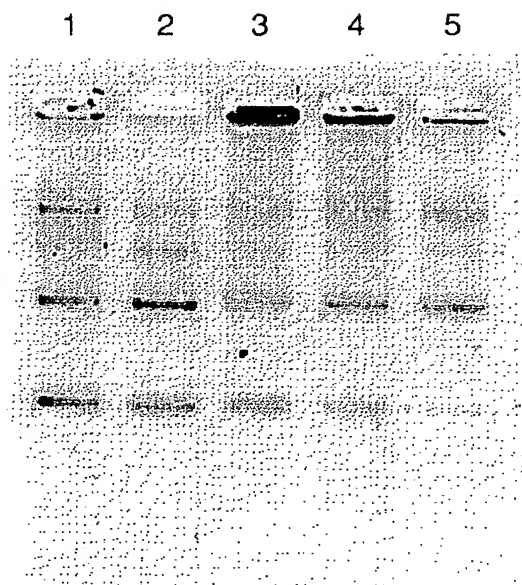
【図 4】



1: 除去処理なし

2: インサートなしプラスミドの除去

【図 5】



1: without RecA reaction  
after miniprep

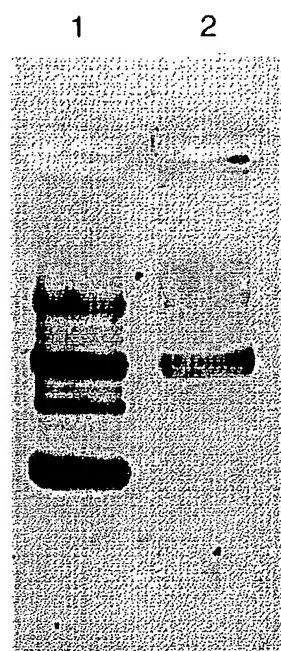
2: with RecA reaction(25mer)  
after miniprep

3: with RecA reaction(30mer)  
after miniprep

4: with RecA reaction(40mer)  
after miniprep

5: with RecA reaction(60mer)  
after miniprep

【図 6】

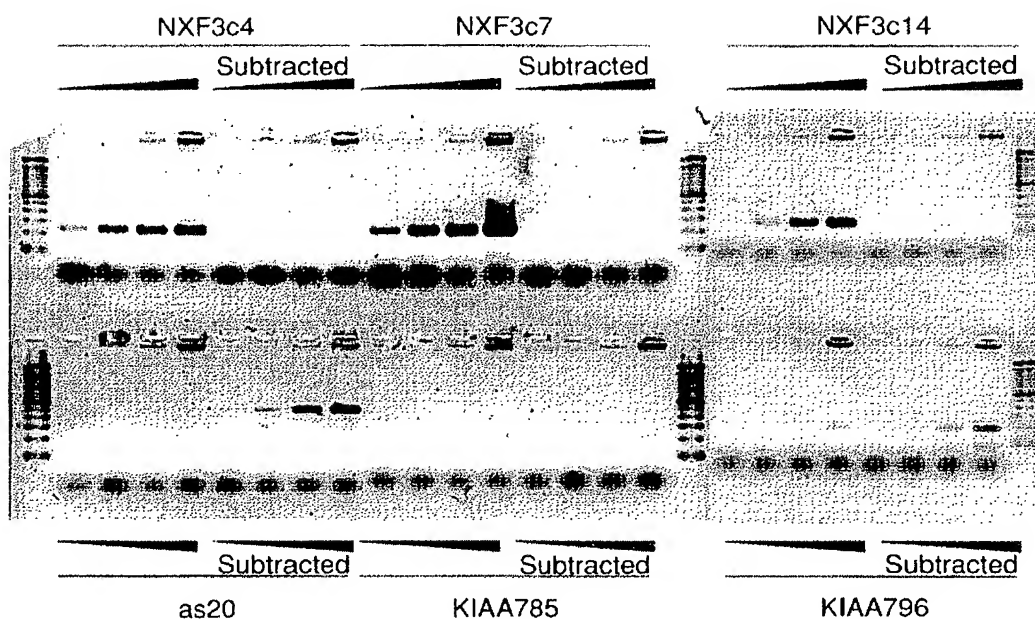


1: 除去処理なし

2: RNAによるインサートなし  
プラスミドの除去

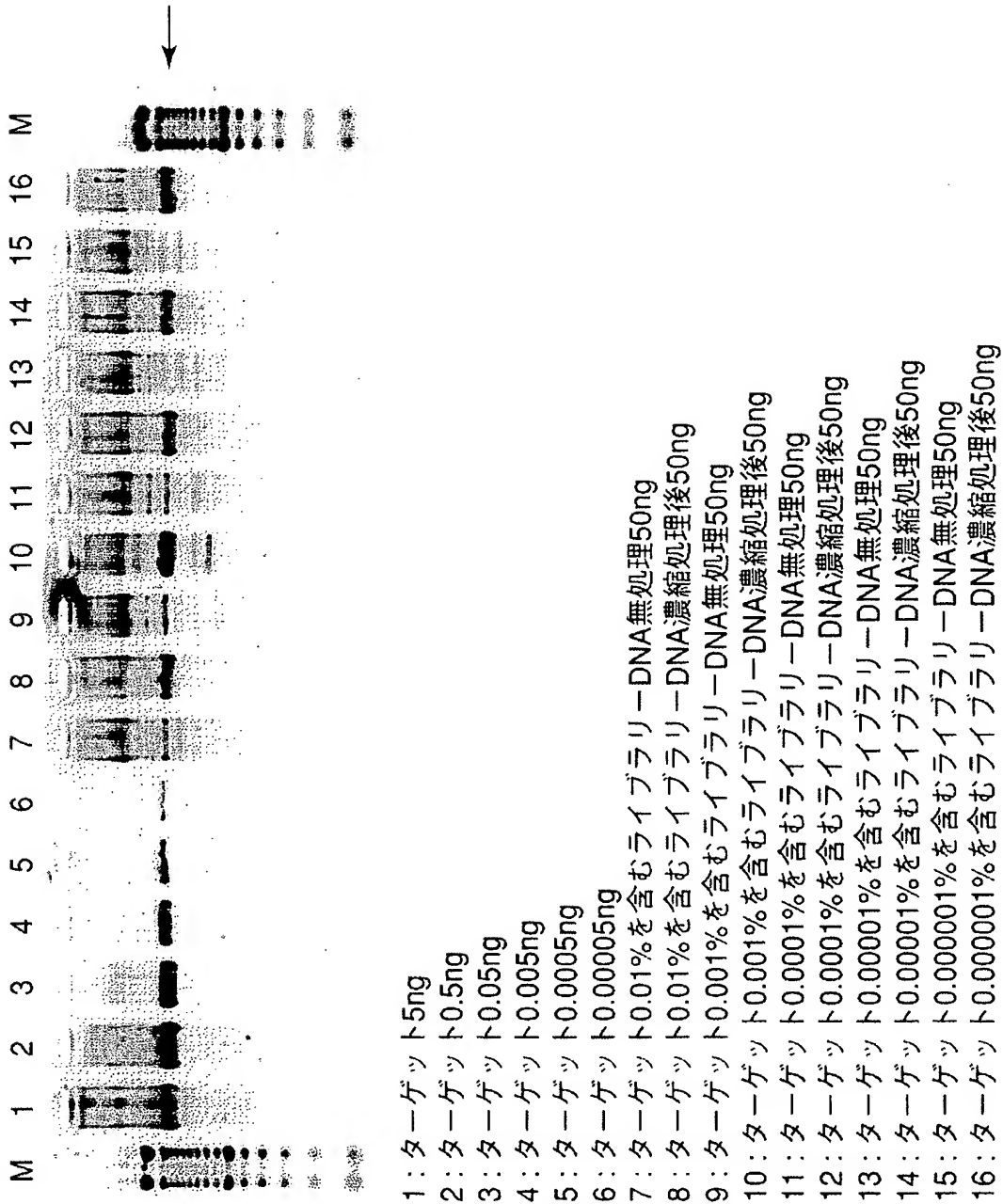


【図 7】



NXF3c4F:GGGATGGAGGTTCTCTTTGGATTCC  
 NXF3c4R:ACCCGTGTAAACAGGAGCCAGA  
 NXF3c7F:TGTCCAGTACAGCGTTCGTTcCT  
 NXF3c7R:TGACAGGTGACGAGTGTGAGCTATC  
 NXF3c14F:GGACGAACTGCTCAAAGCCATTGG  
 NXF3c14R:CGTCATCCCTAAAGTGCTCCTCAAG  
 as20F:GCCACTCCCTTCCCGATTCA  
 as20R:CGAGGCGTAGCTGGTCAATGG  
 KIAA785F : ATATTGCTTGGATTCTACGTG  
 KIAA785R : GGACGTAAGGATAACATTCTG  
 KIAA796F:CTTCGGGCGTGTGGAAAGATAACC  
 KIAA796R:CGAGCGAGAGGGAGAGATTGGA

【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、DNAライブラリーから、所望のDNAを特異的に濃縮または除去されたDNAライブラリーを作製することが可能であり、且つ該DNAのクローンを直接取得することができる方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 上記課題を解決するために、本発明は、RecAタンパク質を用いて環状DNAライブラリーから特定のDNAを除去することにより、所望の核酸の含有率が増加した環状DNAライブラリーを構築する方法を提供する。すなわち、本発明は、含有率を増加せしめるべき第一のdsDNAを含むDNAライブラリーから、第一のdsDNAとは異なる第二のdsDNAを除去することによって、該第一のdsDNAの含有率が増加したDNAライブラリーを構築する方法を提供する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 0 6 8 1 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 3 0 4 3 2 0 0 ]

1. 変更年月日	1 9 9 3 年 3 月 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県刈谷市八軒町 5 丁目 5 0 番地
氏 名	株式会社アイシン・コスモス研究所

特願 2 0 0 3 - 0 6 8 1 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 6 1 7 5 8 1 0 ]

1. 変更年月日	2 0 0 2 年 6 月 1 3 日
[変更理由]	住所変更
住 所	千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 6 - 7
氏 名	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所